

Bevaring av fruktbarhet hos kvinner ved cytostatika- og /eller strålebehandling.

Stud.med. Hege Riekeles
Kull V-01

Litteraturoppgave ved IVF-seksjonen, Kvinneklinikken, Rikshospitalet

Veileder: Dr. med. Tom Gunnar Tanbo, seksjonsoverlege kvinneklinikken

**Prosjektoppgave
Det medisinske fakultet
Universitetet i Oslo**

Oppgavenavn: Bevaring av fruktbarhet hos kvinner ved cytostatika –og/eller strålebehandling

Oppgavetype: Litteraturoppgave

Student: Hege Riekeles

Kull: H-01

Veileder: Dr. med. Tom Gunnar Tanbo
Seksjonsoverlege
Kvinneklinikken, Rikshospitalet

Dato for innlevering: 10.01.07

Innhold.

Innledning	s.4
Kreft hos kvinner <35 år i Norge.....	s.4
Follikulogenese.....	s.7
Effekten av cytostatika- og/eller stråleterapi på follikkelapparatet.....	s.10
Muligheter for bevaring av fruktbarhet.....	s.12
Kryobiologi.....	s.13
Nedfrysning av celler og vev: ulike valg og metoder.....	s.16
Nedfrysning av embryo.....	s.16
Nedfrysning av oocytter.....	s.17
Nedfrysning av ovarialt vev.....	s.18
Fragmenter av ovarialcortex.....	s.18
Isolerte primordialfollikler.....	s.19
Hele ovarier.....	s.20
Risiko.....	s.21
Avslutning/konklusjon.....	s.23
English summary.....	s.23
Litteratur	s.24

Innledning.

Stadige fremskritt innen behandling for kreftsykdom har ført til at overlevelsesraten hos prepubertale jenter og kvinner i fertil alder har bedret seg kraftig. Kjemoterapi og strålebehandling kan føre til reduksjon i antall follikler som resulterer i endringer i produksjonen av kjønnshormoner, og økt forekomst av prematur ovarialsvikt (POF) og infertilitet. Menn som må gjennomgå kreftbehandling med risiko for sterilisering kan fryse ned sædceller til senere bruk, mens kvinner og unge jenter har måttet akseptere at konsekvensen av deres livsnødvendige behandling kan gjøre dem infertile. Med stadig bedre prognose har viktigheten av å beskytte denne gruppen mot iatrogen infertilitet fått større fokus. Ved strålebehandling kan transposisjon av ovariene redusere skader på follikkelapparatet og ved kjemoterapi kan kanskje GnRH-analoger benyttes. Nedfrysning av oocytter eller embryo etter ovarialstimulering og in vitro fertilisering (IVF) kan benyttes hos postpubertale kvinner før kreftbehandling. Hos prepubertale jenter er hormonstimulering etisk uforsvarlig. Ovarialcortex hos unge kvinner kan inneholde flere hundre follikler per mm², og kryopreservering av ovarialvev kan være et alternativ for denne gruppen. Ortotop eller heterotop transplantasjon etter at kvinnen er erklært frisk kan reetablere fertiliteten. Tilbakeføring av nedfrosset ovarialvev kan gjenopprette pasientens menstruasjonssyklus slik at naturlig befruktning og svangerskap kan skje uten behov for assistert befruktning. Det første barnet født etter slik behandling kom til verden i 2004 i Belgia. Nedfrysning av ovarialvev kan også være aktuelt for andre grupper av kvinner som av ulike grunner går i menopause før de har fått barn.

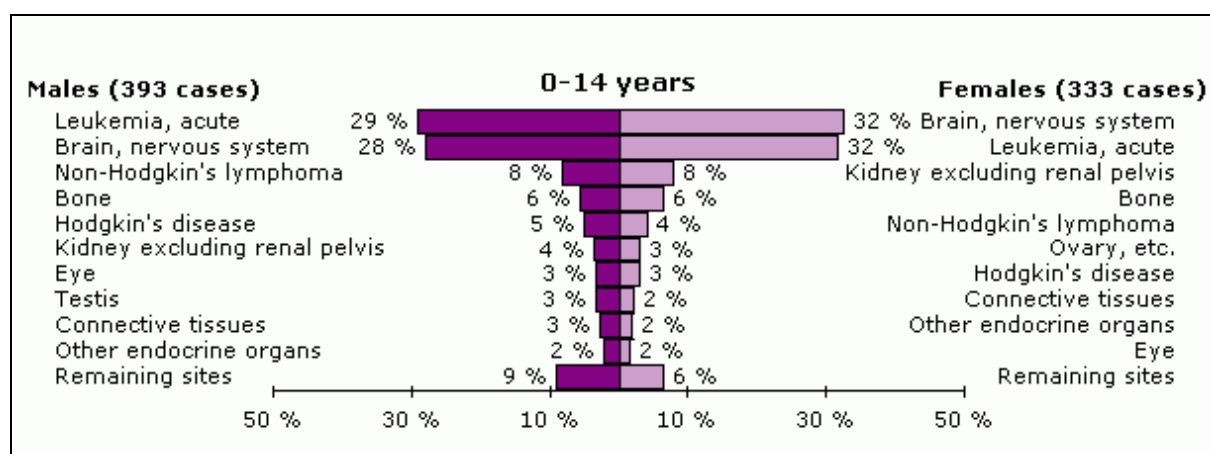
Hensikten med oppgaven er å gjennomgå litteraturen på dette feltet.

Data fra kreftregisteret viser at det blant jenter i alderen 0-14 år i årene 2000-2004 var 321 (0.6%) nye tilfeller av kreft. Vanligst er tumores i CNS og akutt leukemi.. I gruppen 15-29 år var det til sammen 778 nye krefttilfeller. For denne grupen er malignt melanom, svulster i CNS, cervixcancer, Hodgkins lymfom og thyreoideacancer de hyppigst forekommende. Om lag 20% av alle nye krefttilfeller finnes i aldersgruppen 30-54 år, og i denne samt senere aldersgrupper er det brystkreft som er hyppigst forekommende blant kvinner (Tabell 1 og figur 1, 2, 3, 4) (Kreftregisteret. Kreft i Norge 2004. Kreftregisteret 2006). Prognosen ved kreft hos barn og ungdom har bedret seg dramatisk i løpet av de siste 20 årene slik at forventet overlevelse nå er >75% (Smith M, Hare ML, 2004). Som følge av at prognosen stadig blir bedre, kommer senere livskvalitet i fokus, deriblant muligheten til å få barn. Behandling av kreft hos barn innebærer kombinasjoner av kirurgi, strålebehandling, kjemoterapi og benmargstransplantasjon. En viktig bekymring hos kvinnelige pasienter er behandlingens effekt på senere fruktbarhet. Et vellykket svangerskap er avhengig av en fungerende hypotalamus-hypofyse-ovarie-akse og et uterint miljø kan sørge for normal vekst av fosteret frem til termin. Negativ effekt på fruktbarhet kan medieres gjennom forstyrrelse av hypotalamus-hypofyse-ovarie-aksen, (Bath, 2001), ovariet (Bath et al., 2003; Wallace, 1989; Wallace WHB, 2003) og uterus (Critchley, 1992; Bath, 1990). Kjemo-og stråleterapi induserer i varierende grad apoptose i ovariets follikler med økt risiko for senere nedsatt eller opphevet fruktbarhet. Utfordringen er å opprettholde den gode overlevelseshraten og samtidig minimalisere senvirkningene fra de moderne behandlingsformene. Kjemoterapi benyttes også i økende grad ved ikke-maligne sykdommer, f.eks ved systemisk lupus erythematosus (SLE) hvor 90% av pasientene er kvinner i fruktbar alder.

Tabell 1. Kreft hos kvinner fordelt på alder (2000-2004)

Aldersgruppe	Innsidens (%)	Innsidens (n)
0-14	0,6	321
15-29	1,4	778
30-54	20,6	11465
55-74	40,9	28222
75+	36,6	20403

Figur 1. Forekomst av kreft hos barn i Norge.



(Kreftregisteret. Årsrapport 2001)

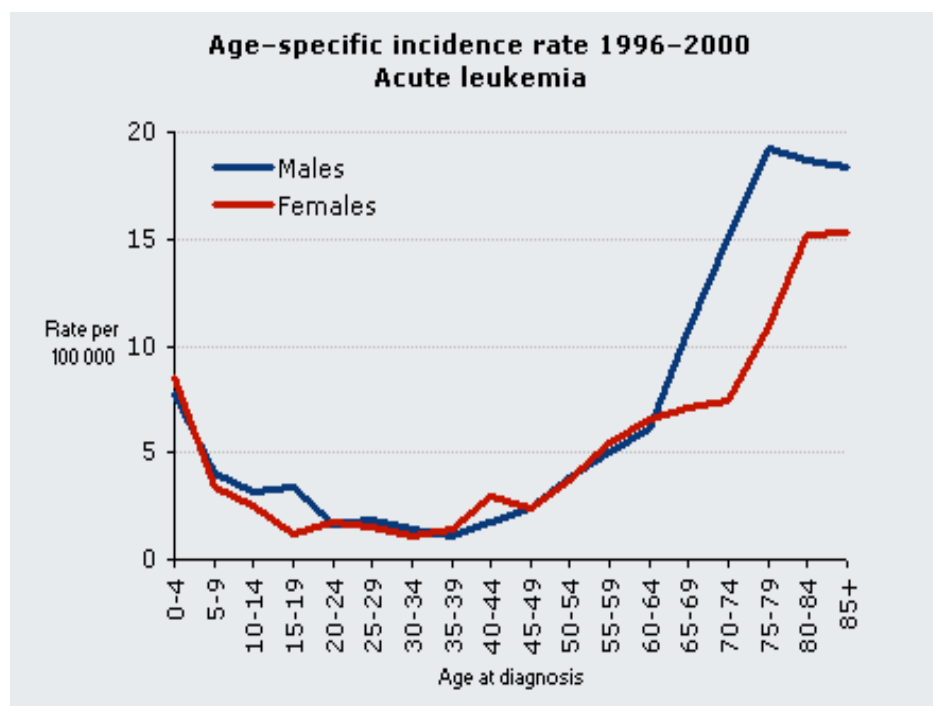


Fig. 2 (Kreftregisteret. Årsrapport 2001)

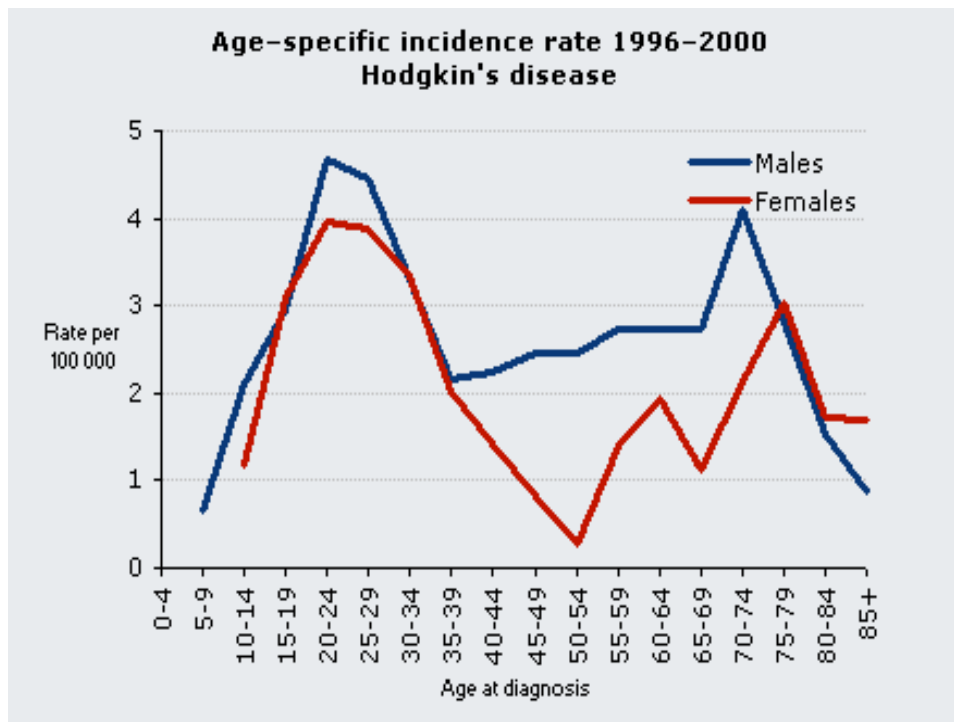


Fig. 3 (Kreftregisteret. Årsrapport 2001)

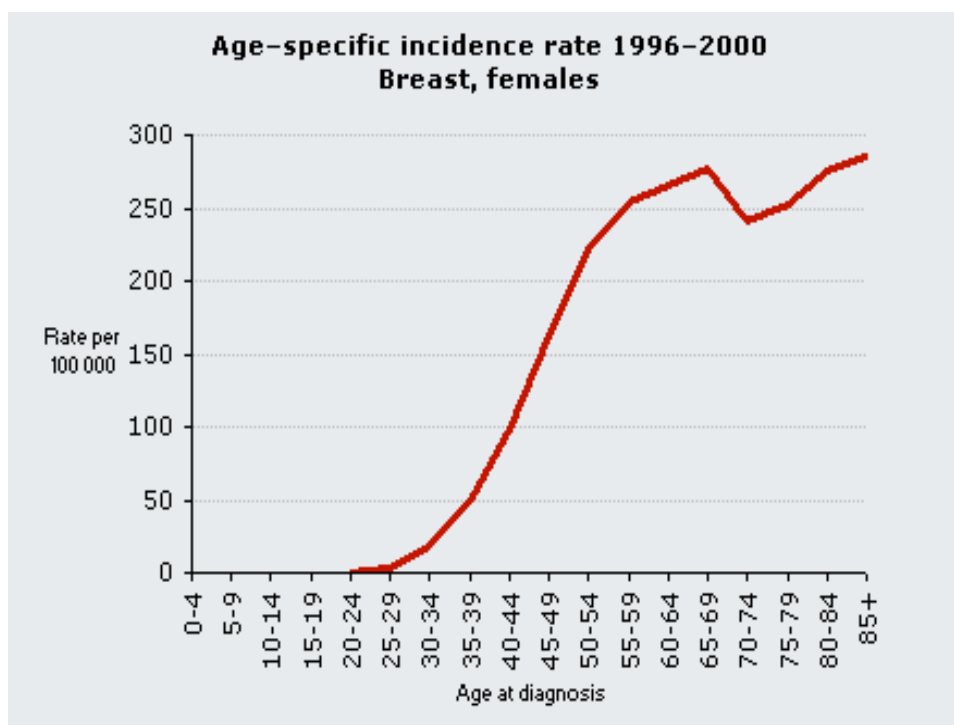


Fig. 4 (Kreftregisteret. Årsrapport 2001)

Follikulogenese.

Hos kvinner dannes alle egganlegg i fosterlivet. De primordiale kjønnscellene oppstår i 4. føtaluke i den endodermale vegg av plommesekken. Herfra migrerer de til ovarieanlegget som

de invaderer rundt uke 6. De differentierer nå til oogonier som i 8.-20. føtaluke proliferer i ovariet ved mitotiske delinger. Oogoniene vokser i størrelse og differentierer til primære oocytter som omgis av et lag epitelceller og danner primordialfollikler. Utviklingen av oocytterne stanser i den diplotene fase den første meiotiske deling og kan aktiveres for videre vekst flere tiår senere. Allerede i føtallivet begynner oogonier og oocytter å undergå atresi. Samtidig opphører proliferasjonen av oogonier helt. Rundt 20. svangerskapsuke er antallet oogonier og oocytter om lag 7 millioner i de to ovarieanleggene til sammen. Ved fødselen er denne kohorten redusert til 1-2 millioner og ved menarke ca. 400 000. (Baker TG, 1963; Baker TG, 1971; Gougeon A, 1996). I løpet av den reproduksjonsdyktige periode medfører atresi av primordiale og voksende follikler – samt det lille antall ovulasjoner – at det ved menopause kun finnes enkelt primordialfollikler igjen. Kun noen hundre follikler vil nå full modning og ovulasjon. Apoptose er en viktig mekanisme for å regulere celledød. Atresi –skjebnen til majoriteten av ovariets follikler– er en hormonelt regulert apoptotisk prosess. Gjennom flere signalsystemer fungerer gonadotropiner sammen med lokale vekstfaktorer som IGF-1, EGF/TGF- α , basic FGF, cytokiner som IL1 β /NO og østrogen som overlevelseshet faktorer for å forhindre atresi av folliklene. Studier har også vist at androgener – i det minste tidlig i follikulogenesen– virker stimulerende på follikkelvekst (Vendola et al., 1998). Motsatt virker TNF- α og Fas ligand antakelig på reseptorer som fremmer celledød. Det antas at disse faktorene interagerer gjennom selektive intracellulære signalveier (bl.a på gener fra bcl-2 og ICE familiene) for å regulere apoptose (Kaipia A, Hsueh AJW, 1997). Reduksjonen av follikler skjer langsomt opp til 38-årsalderen hvor prosessen deretter akselererer. Matematiske modeller viser at follikkeltapet skjer bi-eksponentielt heller enn som en konstant eksponentiell funksjon av alder, med en initielle rate på -0.097 deretter -0.237 (Figur 5.te Velde ER, Sheffer GJ, et al., 1998). Endringen skjer når antall follikler når den kritiske verdien på 25.000 ved 37.5 \pm 1.2 (SD) år. Når antall follikler når denne nedre grense, skjer et tilsvarende fall i inhibin B som resulterer i en selektiv FSH-stigning ved 35-40 årsalderen. FSH –økningen er med på å forklare akselerasjonen i follikkeltapet, den økte andelen av voksende follikler som når det selekterbare nivået i syklusen, den forkortede follikkelfasen og den økte andelen av dizygote tvillinger . Ut fra modellen vil \approx 1000 follikler gjenvære ved 51 \pm 1 (SD) år, noe som tilsvarer den gjennomsnittelige alder for menopause i Vesten . 10% av alle kvinner har nådd menopause når de er 45 år og vil sannsynligvis ha hatt betydelig nedsatt fruktbarhet allerede fra midten av 30-årene når den gjenværende follikkelreserven er blitt en fraksjon av det opprinnelige antallet. (Treolar A.E, 1981; van Noord PA, Dubas JS, Dorland M et al., 1997). Med tanke på in-vitro fertilisering (IVF) synker implantasjonsraten per embryo og sannsynligheten for en graviditet markant rundt 37-38-årsalderen. Ved tilsvarende alder begynner FSH-nivået å stige og menstruasjonssyklusene blir kortere. Alle disse hendelsene

sammenfaller med alderen for når follikkeltapet akselererer. Den økende andelen spontane aborter og kromosomanomalier i embryoer og abortmateriale med stigende alder hos kvinnen, er andre tegn på redusert oocyttkvalitet.(Figur 6. Pellestor F, Andreo B, Arnal F, Humeau C, Demaille J, 2003).De gode resultatene med IVF hos (pre)menopausale kvinner som benytter oocytter fra yngre donorer (Sauer MV, Paulson RJ, Lobo RA.,1993) understreker ytterligere at det er oocytterne heller enn endometriet som fører til dette aldersbetingede fertilitetstapet.

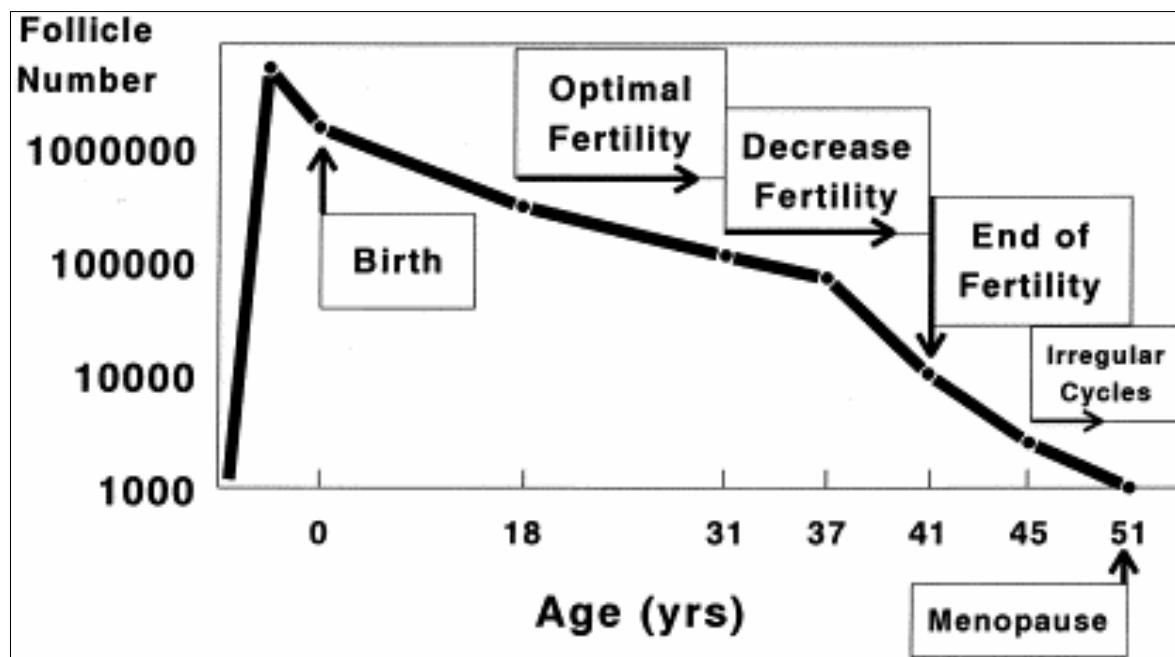


Fig. 5 (te Velde, Sheffer GJ, et al. 1998)

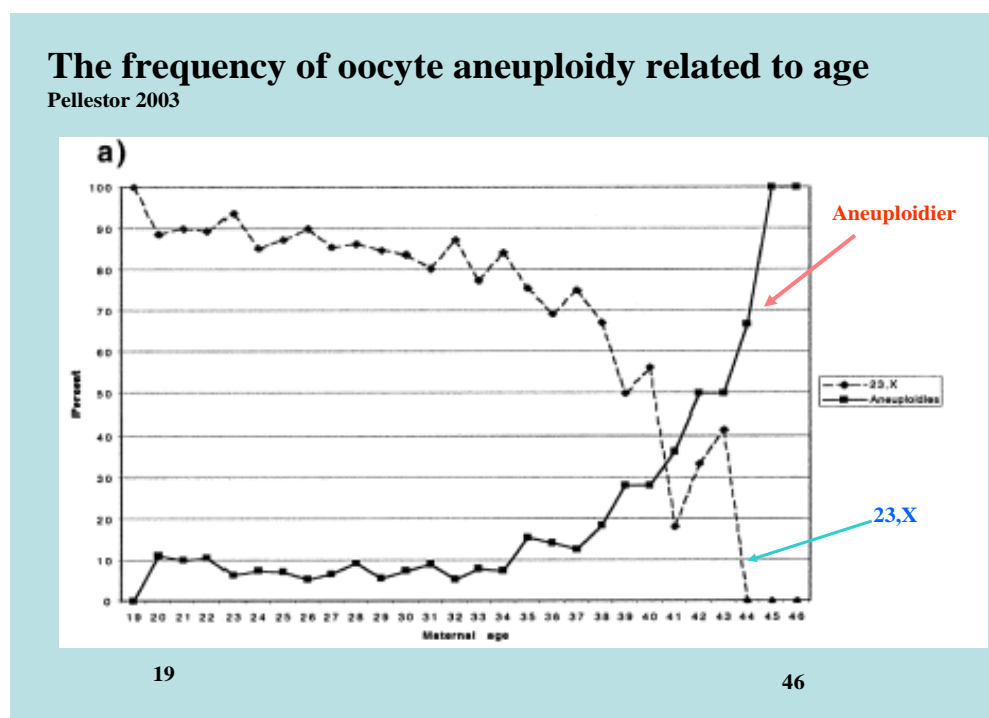


Fig. 6 (Pellestor F, Andreo B, Arnal F, Humeau C, Demaille J, 2003)

Effekten av cytostatika- og/eller stråleterapi på follikkelapparatet.

Kjemoterapi induserer apoptose i primordialfolliklenes pregranulosaceller og forårsaker i tillegg DNA-skade.

Graden av skade på follikkelapparatet er avhengig av hvilke cytostatika som benyttes og dosen. Alkylerende medikamenter som for eksempel cyclofosamid, er de mest skadelige (Tabell 2). Histologisk og immunohistokjemisk sees forstørrelse av pregranulosacellene og deres kjerner samt ødeleggelse av arkitekturen til primordialfolliklene med tap av lumen og dens oocyt (Meirow D, et al., 1998). Merkede apoptosemarkører er påvist i pregranulosacellene som har vært utsatt for kjemoterapeutiske agens, men ikke hos kotrollene. Celler som gjennomgår mitotiske delinger er mer sensitive for den cytotoksiske effekten av kjemoterapi enn hvilende celler. Granulosacellene produserer østrogen og progesteron som stimulerer hvilende primordialfollikler til videre vekst. Nedsatt produksjon av gonadale steroider som resultat av destruksjon av de hormonproduserende cellene, stimulerer hypofysens gonadotropinproduksjon som i sin tur øker rekrutteringen av follikler til poolen av modne follikler som er sårbare for kjemoterapeutiske agens. Den onde sirkelen resulterer i hypergonadotrop hypogonadisme og akselererer tømningen av ovariets oocytter. Eldre kvinner med en mindre primordialfollikkelpool har større risiko for å utvikle umiddelbar ovarialsvikt, sammenlignet med yngre kvinner som har et større reservoar av primordialfollikler. Med økende alder vil derfor permanent skade på gonadene induseres ved lavere dose av det gitte kjemoterapeutikum.

Ioniserende stråling er en veldokumentert årsak til skade på ovariene og permanent infertilitet. Strålebehandling fører til en doseavhengig reduksjon i den primordiale follikkelpoolen. (Gosden et al., 1997). Oocytter hos mennesker er ekstremt sensitive overfor stråler, og strålebehandling mot ovariet med $>6\text{Gy}$ fører vanligvis til irreversibel ovarialsvikt (Howell S, Shalet S, 1998). Wallace et al. (1989b, 2003) demonstrerte at $<4\text{Gy}$ er nok til å ødelegge halvparten av oocyttopulasjonen ($\text{LDL}_{50} <4\text{Gy}$). Ved hjelp av en matematisk modell, antydte de samme forfatterne nylig at LDL_{50} for oocytter er $<2\text{Gy}$ (Wallace et al. 2003). Pasientens alder, behandlingens varighet, strålefelt (abdominalt, ekstern bekkenbestråling, intrakavitær brachyterapi) og fraksjonsplan er viktige prognostiske faktorer for å prediktere utvikling av ovarialsvikt. (Fisher B, Cheung AY, 1984; Lushbaugh CC, Casarett GW, 1976; Tease C, Fisher G, 1991; Morice et al., 2000; Meirow D, Nugent D., 2001). Hos mus er stråleindusert kromosomskade i oocytene mer hyppig hos eldre individer sammenlignet med yngre. (Tease C, Fisher G 1991). Generelt er stråling mer toksisk gitt som enkeldose sammenlignet med fraksjonert dose.

Stråleterapi av hele kroppen, abdomen eller bekkenet vil ikke bare kunne føre til skade på ovariene men også affisere uterus. Den prepubertale uterus er mer utsatt for skader ved

bekkenbestråling. Ved puberteten endres formen på uterus fra tubulær til mer pæreform med økte dimensjoner i alle retninger under påvirkning av østrogen produsert i ovariene. Stråledoser mellom 14 og 30 Gy er rapportert å gi uterin dysfunksjon. De bakenforliggende mekanismene er ikke kjent, men kan være sekundære til redusert elastisitet av uterin muskulatur og skade på blodtilførselen. Prepubertale jenter som etter behandling går i menarke og får regelmessige menstrusjoner kan sannsynligvis også ha fått nedsatt fruktbarhet som følge av behandlingen. I to studier av unge kvinner behandlet for kreft i barne- eller ungdomsårene og som etter behandlingen hadde regelmessige blødninger og normale FSH-verdier, ble det ved ultralydundersøkelse funnet mindre ovarier og færre små antralfollikler enn i en aldersmatchet kontrollgruppe. I den ene studien ble det også funnet at behandlingsgruppen hadde høyere nivå av FSH enn i kontrollgruppen, selv om de begge lå innenfor normalområdet (Bath LE, Wallace WH, Shaw MP et al, 2003). I den andre studien ble det funnet at de som hadde gjennomgått behandling for kreft, hadde kortere menstruasjonssykluser enn kontrollgruppen (Larsen EC, Muller J, Rechnitzer C et al., 2003). Høyt FSH-nivå og kortere menstruasjonssyklus tas til uttrykk for en affeksjon av follikkelapparatet med forventet redusert fruktbarhet og kortere tid til menopause. Negative effekter på svangerskap er beskrevet for kvinner behandlet med radiologi av hele kroppen og omfatter økt risiko for tidlig svangerskapsavbrudd, for tidlige fødsler, og barn født med lav – eller veldig lav fødselsvekt. En økt risiko for barn med lav fødselsvekt (<2500g) og for tidlige fødsler blant mødre som har fått abdominal bestråling for Wilms tumor i barneårene er også beskrevet (Green DM et al., 1989; Green DM., 2001).

Tabell.2 Estimert risiko for gonadal dysfunksjon ved medikamentell cytostatikabehandling.

<u>Høy risiko</u>	<u>Medium risiko</u>	<u>Liten risiko</u>
Cyklofosfamid	Cisplatin	Vincristine
Ifosfamid	Carboplatin	Methotrexate
Chlormethine	Doxorubicin	Dactinomycin
Busulfan		Bleomycin
Melfalan		Mercaptopurine
Procarbazine		Vinblastin
Klorambucil		

Muligheter for bevaring av fruktbarhet

Det finnes flere mulige strategier for å bevare fruktbarheten ved kjemoterapi og/eller strålebehandling. For å redusere strålepåvirkningen på ovariet kan det gjøres en transposisjon. Transposisjon av ovariene (oophoropexy) til utenfor bekkenet er første gang beskrevet i 1958 (McCall ML et al 1958). Prosedyren er indisert hos kvinner i fruktbar alder som behandles med bekkenbestråling ved kreftsykdom, men som ikke trenger å fjerne ovariene. De vanligste indikasjonene er Hodgkin's lymfom, cervical –og vaginal kreft og bakkensarkomer. Ved transposisjon mobiliseres adnexet og fikseres så lateralt og høyt som mulig på bekkenveggen. Kompromitert karforsyning til både tuben og ovariet samt gjentatte cystedannelser er observert, slik at transposisjon nå benyttes i mindre grad enn tidligere (Chambers SK et al 1990, Thibaud E et al 1992).

Siden kjemoterapi har mindre skadelig effekt på follikkelapparatet hos prepubertale jenter enn hos kvinner i reproduktiv alder, har det vært gjort forsøk med å etterlikne et prepubertalt hormonelt miljø hos kvinner i voksen alder. Flere observasjonsstudier hvor gonadotropinfrigjøringshormon(GnRH)-analoger har vært benyttet til dette formål i forbindelse med kjemoterapi har antydnet en gunstig effekt på follikkelapparatet. (Blumenfeld et al 2002). Samtidig viser andre studier at suppresjon av gonadene ikke ser ut til å beskytte ovariene mot kjemo- eller stråleindusert skade. Primordiale follikler har hverken FSH –eller GnRH-reseptorer og en randomisert -men liten- studie viste ingen beskyttende effekt av GnRH-analoger på ovariene (Sonmezer M and Oktay K 2004, Waxman J 1987, Oktay K et al 2004). Det har videre vært gjort vellykkede forsøk på å hemme apoptoseprosessen i ovariet på mus, men forsøk på mennesker er så langt ikke utført (Morita Y et al 1999, Morita Y et al 2000).

For kvinner som skal gjennomgå kjemo -og/eller stråleterapi finnes det i dag flere mulige metoder for å bevare fruktbarheten ved hjelp av kryopreservering av kjønnsceller eller befruktede egg. Nedfrysning av embryo etter IVF fra postpubertale kvinner er en effektiv metode. Kvinner uten fast partner kan fryse ned modne eller umodne oocytter etter hormonstimulering. For prepubertale jenter og kvinner som ikke kan utsette behandlingen er kryopreservering av ovarialt vev det eneste alternativet. Metoden er ennå på forskningsstadiet med tre ulike tilnærminger: nedfrysning av cortexfragmenter, hele ovarier eller isolerte follikler (figur 7).

Kryobiologi, læren om programmert nedfrysning og oppbevaring av celler i suspensjon og små vevsbiter, er blitt et høyaktuelt emne innen medisinsk forskning og behandling, og har en lang forhistorie (tabell 3, Polge C, Smith AU, Parkes AS 1949; Barnes DWH, Loutit JF 1955; Rowley S 1992. Modifisert). Forbedring av nedfrysings- og oppbevaringsteknikkene har gjort det mulig å kryopreservere et stort spekter av celletyper og organbiter.

Det er hovedsakelig to måter å bringe levende celler til dypfryst tilstand på: vitrifisering og langsom kontrollert nedfrysning. Vitrifisering er rask nedfrysning i høy konsentrasjon av stoffer som hindrer danning av iskrystaller, mens langsom, kontrollert nedfrysing er en metode med jevnt temperaturfall, først langsomt, siden raskt i lav konsentrasjon av stoffer som hindrer danning av iskrystaller. Vitrifisering var omtalt allerede i 1930-årene og antatt som den beste metoden for preservering av celler og vev (Luyet B. 1937), men ennå har man ikke klart å gjøre metoden effektiv for klinisk eller kommersiell bruk. Standardmetoden som er blitt brukt er derfor langsom, kontrollert nedfrysing (Hubel A 1997). Når vannet i en løsning krystalliseres, fryser løsningen. Da alle celler består av om lag 2/3 vann, vil det ved nedfrysing dannes intracellulære iskrystaller, som ødelegger cellene. Hvis man sørger for tilstrekkelig langsom nedkjøling og god permeabilitet for vann gjennom cellemembranen, forblir det isfritt intracellulært (Mazur P 1963). Dersom nedfrysingen skjer for raskt, vil ikke cellen kunne frakte vann hurtig nok ut, og det blir dannet intracellulære iskrystaller. Økende kjølehastighet gir økt intracellulær isdannelse. Ettersom krystallene vokser, fjernes vann fra væskefasen, og konsentrasjonen av elektrolytter og proteiner øker kraftig. Dette utsetter cellene for osmotisk stress, og cellene dehydreres gjennom osmose. På den motsatte siden vil for langsom nedfrysing føre til langvarig eksponering for høye ekstracellulære konsentrasjoner av salter, proteiner og nødvendige tilsetningsstoffer. Både for hurtig og for langsom nedfrysing vil altså kunne skade cellen. Derfor finnes det en optimal nedfrysingshastighet. Dette er hovedprinsippet for den langsomme, kontrollerte nedfrysingen (Pegg DE 2002). Når cellene er ført til dypfryst tilstand, kan de lagres i et varierende tidsrom, fra bare noen uker ved -20 °C til flere tiår i flytende nitrogen (-196 °C).

I prosessen skades cellene av termiske, mekaniske og kjemiske krefter (Tabell 4, oversatt og modifisert etter "Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue" Shaw, Oranratnachai, Trounson, 2000). Krystallutviklingen ekstracellulært kan skade cellene på to måter: direkte ved at cellene sprenges, og indirekte ved at is er et dårlig løsningsmiddel, og proteiner, elektrolytter og frysestoffer konsentreres i den gjenværende væsken når det dannes is. For eksempel øker NaCl-konsentrasjonen i en isoton løsning 32 ganger fra 4° til -21 °C (Lovelock J 1953). Dette vil utsette cellene for osmotisk stress. Ved tilstrekkelig langsom

nedfrysing dehydreres cellene ved osmose. Molekyler i cellen med polare deler søker da å danne hydrogenbindinger med andre stoffer enn vann. Dette kan føre til sammenklumping og denaturering av proteiner samt destabilisering av cellemembranen. Dersom det er blitt dannet intracellulær is under nedkjølingen, vil en langsom opptiningsprosess gjøre at iskrystallene vokser og skader cellene ytterligere. Celler som er blitt fryst langsomt ned, har best av å bli tint hurtig opp igjen. Man forsøker å begrense graden av celledskade ved å tilsette såkalte kryobeskyttende stoffer (Hubel A 1997). De skal forhindre skade og øke overlevelse. Deres måte å virke på er ikke fullt klarlagt, men baserer seg på følgende hovedprinsipper:

1. Beskytte mot potensielt toksisk elektrolyttkonsentrasjon

2. Redusere effekten av dehydrering

3. Redusere isdanning

4. Stoppe frie radikaler

5. Danne hydrogenbindinger med polare molekyler

6. Stabilisere cellemembranen

Eksempler på slike stoffer er glyserol og dimetylsulfoksid (DMSO), og nye lovende stoffer som propan-1,2-diol og butan-2,3-diol. Gjennom celledskade som opptrer ved slik nedfrysing, hvor både termiske, mekaniske og kjemiske krefter virker på cellen, kan apoptose aktiveres (Abrahamsen J, Bakken AM, Bruserud Ø et al 2002). På den bakgrunnen er det gjort forsøk med å tilsette apoptosehemmere i fryseløsningen for å hindre for stor celledød. Derved overlever flere av cellene. Tilsetting av serum, dvs. makromolekyler, til frysemediet er også med på å beskytte cellene.

Vitrifisering fører til glassaktig solidisering av levende celler ved at viskositeten økes slik at væsken kan gå raskt over i fast fase uten at det dannes iskrystaller (Kuleshova LL, Lopata A 2002). Vannet går da over i fast fase sammen med cellene, hvor man fullstendig unngår danning av iskrystaller under kjøling og oppvarming, både intracellulært og ekstracellulært. Anvendelsen er vanskelig på grunn av de potensielt toksiske, høye konsentrasjonene av kryoprotektanter og de spesielt høye nedfrysingshastighetene som er nødvendige. Ved vitrifisering er kjølingshastigheten om lag 400 °C per minutt, mens ved programmert nedfrysing kan den være på 2.0 °C per minutt inntil man oppnår fullstendig solid vannfase. Deretter skjer nedfrysingen videre med 0.3°C per minutt inntil lagringstemperaturen. Fortsatt er det et stort behov for større kunnskap om molekylære mekanismer for celledskade under

nedfrysing, ettersom verktøyene man har for lagring av levende celler og vev ligger langt etter den medisinske utviklingen ellers. Mye gjenstår også i overføring fra teori til praktisk klinisk bruk. Samtidig er det behov for større forståelse av fysiokjemiske prosesser som fører til celledskade og mer kunnskap om hvorledes ulike organismer overlever ekstrem kulde eller dehydrering. Foreløpig er ødeleggelse av ekstracellulære strukturer gjennom danning av is hovedproblemet. Effektive metoder for vitrifisering vil derfor kunne løse problemene. Wang og medarbeidere har allerede beskrevet vellykket transplantasjon av ovarier og tuber hos rotter etter bruk av slik fryseteknikk (Wang X, Chen H, Yin H et al 2002), og nye tilsetningsstoffer vil kunne forbedre resultatene ytterligere (Zhang X, Li K, Tau KH et al 2003).

Tabell 3 Viktige fremskritt innen kryobiologi

1776	Spermier fryst ned i snø, gjenvinner sin motilitet etter tining	Spallanzani
1866	Nedfrysing av røde blodceller	Ponchet
1898	Vitrifisering beskrives	Tamman
1938	Spermier gjenvinner motilitet etter å ha vært preservert ved -196 °C eller -70 °C	Jahnel
1948	Svangerskap hos kanin etter lagring av kaninembryo med kryogene teknikker	Chang
1949	Oppdagelsen av at glyseroltilsetning beskytter mot fryseskade	Polge, Smith & Parkes
1953	Første graviditet etter inseminering av spermier oppbevart ved hjelp av kryoteknikk	Bunge & Sherman
1955	Kryopreserverte celler fra milt kan injiseres etter letale strålingsdoser, og gir hematologisk restitusjon hos mus	Barnes & Loutit
1963	Teori om kryogen skade av celler	Mazur
1974	Metode for kontrollert nedfrysing av cornea utvikles. Benyttes kun i kort tid	Sperling
1974	Bruk av ulike krystallhindrende tilsetningsstoffer	Bank & Mauer
1984	Første fødsler etter implantasjon av humant embryo, oppbevart ved hjelp av kryoteknikk	Zeilmaker
1994	Ovarialt vev fra sauer oppbevart ved hjelp av kryogene teknikker, og deretter transplantert med påfølgende svangerskap.	Gosden
2004	Det første levendeføtte menneskebarnet etter kryopreservering av ovarialvev og påfølgende ortotop autptransplantasjon kommer til verden til verden i Belgia	Donnez

Tabell 4. Faktorer assosiert med kjøling og kryopreservering som bidrar til celledskade og død i biologiske systemer.

Cellebiologisk system:	Type/årsak til skade:
Alle	Intracellulær isdannelse, ekstracellulær isdannelse, apoptose, toksisitet, kalsium-ubalanse, frie radikaler, ATP-nivåer, metabolisme
Membraner	Ruptur, lekkasje, fusjon, mikrovilli, fasetransisjon
Kromosomer	Tap/tillegg, polyspermi, tetraploidi
DNA	Apoptose, fusjon, rearrangering
Cytoskjelett	Mikrotubuli, aktin
Proteiner/enzymer	Dehydrering, tap av funksjon
Ultrastruktur	Mikrovilli, mitokondrier, vesikler, kortikale granula, zona pellucida
Zona pellucida	Hardere, frakturerer
Lipider	Frie radikaler?

Nedfrysning av kjønnsceller og ovarialt vev: ulike valg og metoder.

Nedfrysning av embryo

Hos kreftpasienter kan det gjøres IVF og nedfrysning av embryo for senere bruk dersom pasienten har en partner og det er nok tid før kreftbehandlingen må igangsettes. Metoden er effektiv med en overlevelsesrate per tinte embryo på mellom 35 og 90%, implantasjonrate på mellom 8 og 30% og kumulativ graviditetsrate som kan være >60% (Al-Shawaf et al.,2000; Wang et al.,2001; Son et al.,2003). Men til tross for metodens effektivitet er det flere ulemper knyttet til den bruk. For det første krever den etter norsk lov at pasienten er gift eller stabilt samboende. Videre må pasienten gjennomgå en hormonstimulering som innebærer en utsettelse av behandlingen på minst tre uker.Dette er i mange tilfeller ikke akseptabelt. I tillegg vil ovarialstimuleringen medføre høye østrogenkonsentrasjoner, noe som er kontraindisert hos pasienter med østrogensensitive krefttyper.

Selv om IVF kan basere seg på spontane ovulasjoner (Brown et al.,1996) vil det begrensede antallet egnede oocytter gjøre det svært lite sannsynlig at forsøket resulterer i en levende fødsel.

Antiøstrogen (Tamoxifen) og aromatasehemmer (Letrozole) har vært forsøkt som alternative medikamenter ved ovarialstimulering for IVF og kryopreservering av embryo med noe suksess, og vil trolig kunne representere et sikrere alternativ til tradisjonell hormonstimulering for disse pasientene (Oktay et al.,2005). Hormonstimulering er etisk uforsvarlig hos unge, prepubertale jenter da de samtidig vil gå i pubertet.

Som konklusjon er nedfrysning av embryo en effektiv metode, men kan bare benyttes hos de pasienter som det er mulig å høste oocytter fra og som i tillegg har fast partner.

Nedfrysning av oocytter

Nedfrysning av embryo er ikke et alternativ for single kvinner. For disse pasientene kan nedfrysning av modne eller umodne oocytter være en mulighet dersom de har nok tid i forkant av kreftbehandlingen til å gjennomgå ovarialstimulering. Men også for denne gruppen er problemet at de i svært mange tilfeller ikke kan utsette oppstart av behandlingen.

Chen (1986) rapporterte om det første levendefødte barnet fra nedfrossede oocytter, og i 1997 ble det første barnet født som resultat av intracytoplasmatisk spermieinjeksjon (ICSI) anvendt på nedfrossede-opptinte oocytter (Porcu et al., 1997). Men til forskjell fra kryopreservering av embryo, har resultatene etter nedfrysning av oocytter vært skuffende, med lav overlevelseshastighet og graviditetsrate etter IVF behandling (Mandelbaum et al., 1988; Imoedemhe og Sigue, 1992; Oktay et al., 2001a).

Den modne (metafase II) oocytten er svært sårbar på grunn av sin store størrelse, høye vanninnhold og arrangementen av kromosomene på den meiotiske spindel. I metafasen er kromosomene ordnet i ekvatorialplanet av den meiotiske spindelen. Intracellulær isdannelse i forbindelse med fryse/tineprosessen har vist seg å skade spindelapparatet (Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO, 2000; Baka SG, Toth TL, Veeck LL et al., 1995). Cellen risikerer dermed å miste kromosomer og bli aneuploid. Et annet problem som trolig også er forårsaket av fryseprosessen, er at zona pellucida blir hardere, og dermed utgjør en barriere for naturlig spermiepenetrasjon. Dette har vært forsøkt løst ved å benytte ICSI (Kazem et al., 1995; Tucker et al., 1996; Porcu, 2001; Katayama et al., 2003).

Per dags dato er den mest brukte fremgangsmåten for nedfrysning av oocytter langsom nedfrysning kombinert med rask opptining. Dette er også den samme metoden som ble benyttet av Chen (1986). I senere tid har forsøk gjort med vitrifikering gitt oppløftende resultater. Høye konsentrasjoner med kryoprotektaner i kombinasjon med svært rask nedkjøling, skal gi et glassaktig resultat uten at det danner seg is. Vitrifikering av modne oocytter med etylenglykol og dimetylsulfoksid som kryoprotektanter har vist bedre overlevelse etter opptining og høyere fertiliseringsrate enn tidligere forsøk med langsom, kontrollert nedfrysning, og det er født flere friske barn. Men det er behov for mer dokumentasjon rundt potensielt skadelige effekter de svært høye konsentrasjonene av kryoprotektanter kan ha.

Skadene under fryse/tineprosessen vil avhenge av hvilket modenhetsstadium oocytten befinner seg på. Umodne oocytter i den diplotene fase av profase I eller germinale vesikler (GV)

mangler den meiotiske spindel og er mindre sårbare for kromosomaneuploidier (Baka SG, Toth TL, Veeck LL et al., 1995). Men til tross for bedre overlevelse etter opptining, er det knyttet problemer til modningen av oocytterne in vitro (Park et al., 1997). Bare noen få graviditeter er rapportert etter kryopreservering av umodne oocytter (Tucker et al., 1996; Wu et al., 2001).

Nedfrysning av ovarialvev

Hos prepubertale jenter vil nedfrysning av ovarialvev kunne være et alternativ. Likeledes vil det være en mulighet for kvinner uten fast partner eller når behandling må igangsettes raskt (Gosden et al., 1994; Donnez og Brassil, 1998; Meirow et al., 1998; Oktay et al., 1998a; Donnez et al., 2000, 2005). Målet med denne behandlingen er å reimplantere kortikalt ovarialvev i bekkenhulen (ortotop autotransplantasjon) eller til et annet sted på kroppen som subcutant på magen eller underarmen (heterotop autotransplantasjon) etter at behandlingen er avsluttet og pasienten er sykdomsfri. Andre strategier som transplantasjon av kryopreserverte isolerte primordialfollikler og hele ovarier er også under utvikling.

Fragmenter av ovarialcortex

Ovarialcortex inneholder primordialfollikler i den diplotene fase av profase I. Deres høye overflate/volum-ratio, lave metabolisme og fraværet av zona pellucida gjør primordialfolliklene mindre sårbare for kryopreservering. Ved preparering for nedfrysning fjernes ovarialcortex laparoskopisk eller ved laparotomi og kuttes i vevsfragmenter på ca 1-3mm i tykkelse og ca 1 cm² i total størrelse. Det er vanlig å analysere en del av vevet for å forsikre seg om at det inneholder primordialfollikler og at det ikke er maligne metastaser til stede (Sonmezer og Oktay, 2004). Etter at vevet er kryopreservert er det flere mulige bruksmåter; vevet kan transplanteres tilbake til pasienten (autotransplantasjon) eller til immunsupprimerte (SCID) mus (xenotransplantasjon), eller folliklene kan dyrkes in vitro. To ulike metoder er benyttet på mennesker ved autotransplantasjon: ortotop og heterotop.

Ved ortotop transplantasjon tilbakeføres ovarialvevet til bekkenhulen i håp om at normal funksjon skal gjenopprettes og en naturlig befruktning skal kunne skje. I 2004 rapporterte Donnez et al. det første levendefødte barnet etter denne prosedyren (Donnez et al., 2004).

Heterotop transplantasjon er en alternativ fremgangsmåte der kryopreservert ovarialvev blir transplantert til et område utenfor bekkenhulen. Transplantasjon til et heterotopt område som underarm eller mage er teknisk lettere og mindre risikofyllt enn ortotop transplantasjon, og det er lettere å følge follikkelveksten (Oktay, Economos, Kan et al., 2001; Oktay, Buyuk,

Rosenwaks et al.,2003; Oktay, Buyuk, Veeck et al.,2004). Metoden krever derimot IVF og embryotransfer for at en graviditet skal kunne skje.

Risikoen ved autotransplantasjon hos tidligere kreftpasienter er faren for å reintrodusere maligne celler sammen med ovarialvevet. Risikoen er størst for blodbårne krefttyper som leukemi (Shaw, Bowles, Koopman et al.,1996).

SCID mus kan være vertsdyr for vev fra andre dyr og mennesker uten å avstøte vevet på grunn av en svikt i både det T -og B-cellemedierte immunforsvaret. Xenotransplantasjon av kryopreservert ovarialvev til SCID mus har vært vellykket, med normale follikler til stede når graftene ble fjernet etter 22 uker (Oktay, Gosden, Newton, 2000). Ved å bruke denne xenotransplantasjon og oocyttaspirasjon er faren for å tilbakeføre kreftceller eliminert, da maligne celler ikke går i gjennom zona pellucida. En annen fordel er at prosedyren kan være et alternativ for kvinner som ikke kan gjennomføre hormonstimulering. Men muligheten for å overføre virus og prioner sammen med de høstede folliklene gjør at metoden neppe vil benyttes på mennesker i den nærmeste fremtid.

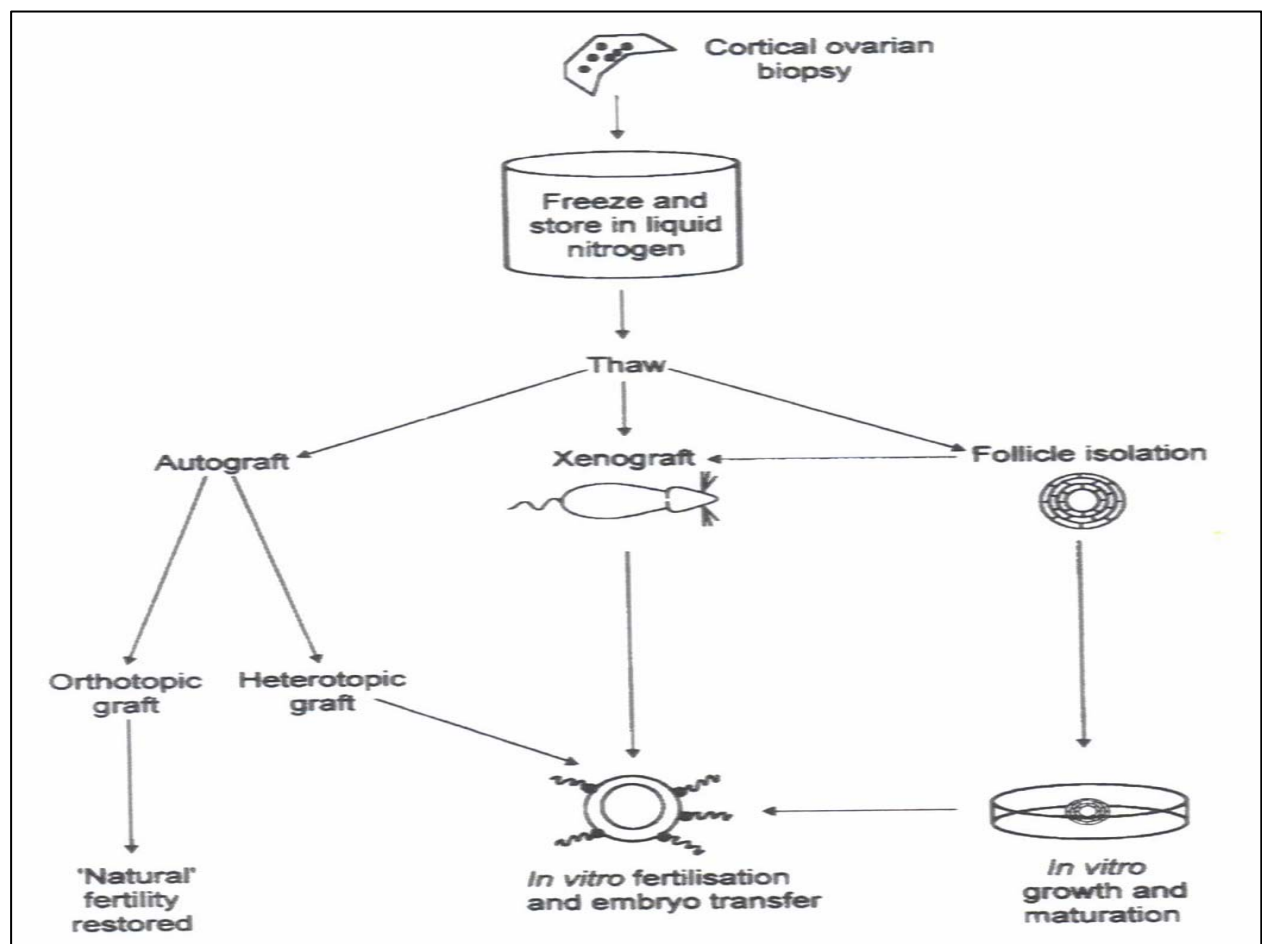
Isolerte primordialfollikler

Oocytten i primordialfollikkelen har en relativt inaktiv metabolisme og mangler den meiotiske spindel, zona pellucida og kortikale granula. Disse egenskapene gjør den motstandsdyktig mot kryoskader. I tillegg penetrerer kryoprotektant lett på grunn av dens lille størrelse. Ved autotransplantasjon av ovarialvev er det en risiko for å reintrodusere tumorceller til pasienten. Ovarialvevskultur med in vitro follikkelmodning kan gjøres, men et annet attraktivt alternativ er dyrking av isolerte primordialfollikler. Primordialfolliklene representerer >90% av follikkelreserven og viser høy kryotoleranse (Smitz og Cortvrindt, 2002). Problemet ved metoden er at primordialfollikler vanskelig lar seg dyrke i kultur (Hovatta et al.,1999; Abir et al., 2001). Transplantasjon av en suspensjon av isolerte follikler er en annen tilnærming. Transplantasjon av nedfrossede-opptinte primordialfollikler er gjort hos mus med normalt avkom (Carrol og Gosden, 1993). Humane primordialfollikler er derimot ikke mulig å isolere mekanisk på grunn av sin størrelse (30-40 µm) og deres fibrøse og tette stroma. Det er derfor benyttet enzymatisk nedbrytning med kollagenaser og Liberase (rensede kollagenase enzymer) (Dolmans et al., 2006). Overlevelse av grafted, humane isolerte primordialfollikler i nakne mus er estimert til å være >60%. Dette vil derfor være et interessant alternativ i fremtiden dersom risikoen for å reintrodusere maligne celler ved autografting av kortikale ovarialfragmenter ikke kan utelukkes.

Hele ovarier

Nedfrysning av hele ovarier fra mennesker er problematisk da det foreligger stor fare for ischemiskade før hele organet er fryst ned. Det er i imidlertid foretatt vellykket kryopreservering og autotransplantasjon av hele ovarier fra sau som har samme tette, fibrøse stroma og høye tetthet av primordialfollikler i cortex som hos mennseker (Arav A, Revel A, Nathan Y et al.,2005). Det første tilfellet med gjenopprettet fertilitet etter transplantasjon av hele, nedfrossede ovarier ble beskrevet av Wang et al. i 2002. De rapporterte om vellykket transplantasjon av nedfrossede-opptinte rotteovaries. Hos fire av syv (57%) transplantater som overlevde i >60 dager, forekom ovulasjon som resulterte i en graviditet. Chen et al. (2005) viste at nedfrossede-opptinte kanino-varier opprettholdt funksjonen i minst 7 måneder etter mikrovaskulær transplantasjon i 13 av 15 (86,7%) dyr. Hos store pattedyr og mennesker byr kryopreservering på flere problemer enn hos mindre dyr på grunn av utfordringer knyttet til adekvat diffusjon av kryoprotektanter inn i større vevsmasser og vaskulære skader forårsaket av isdannelse. Nylig beskrev Martinez-Madrid et al. en fremgangsmåte for nedfrysning av hele ovarier fra mennesker som viste høy overlevelsesrate for follikler (75,1%), små blodårer og stroma og normal histologisk struktur i alle ovariets komponenter etter opptining (Martinez-Madrid et al.,2004b).

Figur 7. Strategier for bruk av kryopreservert ovarialvev. (Newton H, 1998)



Risiko.

Den største risikoen knyttet til nedfrysning av ovarialvev er muligheten for å reintrodusere maligne celler ved autotransplantasjon. Ideelt sett skulle kryopreservering av ovarialvev med det formål å senere skulle autotransplanteres, bare gjøres på pasienter med en lav risiko for metastaser til ovariene. Som oppsummert av Sonmezer og Oktay (2004) inkluderer krefttyper med lav risiko for ovarialinvolvering Wilms tumor, Ewing sarkom, brystkreft stadium I-III, non-Hodgkins -og Hodgkins lymfom, ikke-genital rhabdomyosarkom, osteogen sarkom og cervical plateepitelcarcinom. Krefttyper med moderat risiko inkluderer brystkreft stadium IV, kolonkreft og cervikalt carcinom. Høy risiko for ovarialinvolvering opptrer ved leukemi, neuroblastom, genital rhabdomyosarkom og Burkitt lymfom (Chu JY et al., 1981; Wyld PJ et al., 1983; Yada-Hashimoto N et al., 2003; McCarville MB et al., 2001; Oktay K et al., 2001) (Tabell 5). Pasienter med høyrisiko krefttyper som f.eks leukemi, skal enten ikke bli gitt muligheten til ovarial autotransplantasjon, eller så bør høsting av ovarialvev skje etter første runde med kjemoterapi for å minimalisere eller eliminere neoplastiske celler som måtte

befinne seg i ovariet. I de tilfeller hvor det med stor sannsynlighet befinner seg mikrometastaser, bør pasienten bli rådet til å unngå fremtidig autotransplantasjon. For å eliminere risikoen for å tilbakeføre cancerceller, kan teknikker som modning av primordialfollikler in-vitro eller xenografting av ovarialvev for senere å høste oocytter, bli aktuelle alternativer når pågående forskning gir større kunnskap om risikoer og fordeler knyttet til disse metodene. Uavhengig av krefttype er det viktig at det gjøres en grundig, histologisk undersøkelse med hensyn til mikrometastaser på deler av det høstede materialet i forkant av kryopreserveringen (Oktay KH, Yih M, 2002). Når en genetisk markør blir tilgjengelig, vil det også være mulig å screene ovarialvevet for tilstedeværelse av okkulte cancerceller ved å bruke molekylærbiologiske teknikker (Oktay K, 2001).

En annen risiko knyttet til transplantasjon av ovarialvev, er malign transformasjon.

Indikasjonene for høsting av ovarialvev er i all hovedsak kreft. Disse pasientene har også en risiko for å ha kreft i andre organer, inkludert ovariene. Spesielt pasienter med BRCA-1 og BRCA-2-mutasjoner har henholdsvis en 60% og en 10-20% livstidsrisiko for å utvikle ovarialcancer (Struewing JP, Abeliovich D, Peretz T, et al., 1995; Struewing JP, Hartge P, Wacholder S, et al., 1997; Liede A, Narod SA, 2002). Disse pasientene får ofte utført profylaktisk oophorektomi for å minske sjansen for ovarial kreft med 90%, eller som ledd i en behandlingsplan for brystkreft (Kauff ND, Satagopan JM, Robson ME, et al., 2002; Rebbeck TR, Lynch HT, Neuhausen SL, et al., 2002). Ortotop transplantasjon vil ikke tilbys disse pasientene. Det kan vurderes å gjøre heterotop transplantasjon, men vevet skal fjernes i sin helhet etter at fertilitetsbehandlingen er fullført. Hos disse pasientene kan modning in-vitro og xenotransplantasjon bli fremtidige alternativer (Sonmezer M, Oktay K, 2004). En fullstendig ukjent variabel som krever oppfølging over lang tid, er spørsmålet knyttet til malign transformasjon av epitel- eller kjønnsceller i transplantert ovarialvev, sekundært til det raske temperaturfallet og eksponeringen for kryoprotektanter under nedfrysningsprosessen.

Modning in-vitro og xenotransplantasjon av ovarialvev kan en dag bli vanlige prosedyrer i tilknytning til ovarial kryopreservering. Også disse teknikkene medfører store risikoer. Epigenetiske abnormaliteter sekundært til metyleringsdefekter kan være et stort problem (Lucifero D, Mertineit C, Dlarke HJ, et al., 2002). Xenotransplantasjon til for eksempel SCID-mus, vil unngå risikoene knyttet til ortotop eller heterotop transplantasjon, men transmisjon av prioner og virus sammen med de høstede oocytene vil være en risiko.

Tabell 5. Risiko for spredning til ovarier ved forskjellige krefttyper (Sonmezer & Oktay 2004)

Høy risiko (>11%)	Moderat risiko (0,2 – 11%)	Lav risiko (<0,2%)
Leukemi	Brystkreft (stadiet iv)	Brystkreft (i-iii)
Neuroblastom	Colon cancer	Hodgkin lymfom
Burkitt lymfom	Cervix adenocarcinom	Non-Hodgkin lymfom
Genital rhabdomyosarkom		Wilms tumor
		Ewings sarkom
		Osteogent sarkom
		Cervix plateepitelcarcinom
		Ikke-genital rhabdomyosarkom

Avslutning/konklusjon.

Overlevelsesraten etter kreftsykdom hos prepubertale jenter og kvinner i fertil alder har forbedret seg betydelig, og nye metoder for å bevare fruktbarheten hos denne pasientgruppen er under stadig utvikling. Mulighetene i hvert tilfelle vil avhenge av pasientens alder, hvor mye tid som er til rådighet før kreftbehandlingen må starte opp, krefttype og risikoen for malign spredning til ovariene. Hvilken metode som vil være best egnet for den enkelte pasient er spesielt vanskelig siden flere av metodene ennå må betraktes som eksperimentell forskning. Med unntak av nedfrysning av embryo er kryopreservering av kvinnelige kjønnsceller og ovarialvev ennå på forskerstadiet. Videre utvikling av dagens teknikker og mer dokumentasjon knyttet til effektivitet og potensielle risikofaktorer er nødvendig. Likevel gir levendefødte barn etter transplantasjon av kryopreservert ovarialvev optimistiske håp for fremtiden.

English summary.

Current advances in the treatment of malignant diseases by chemotherapy and radiotherapy are saving an increasing numbers of lives. However, cancer treatment can cause changes in sex hormone production, premature ovarian failure and infertility. As survival rates for young girls and women of reproductive age improve, protection against iatrogenic infertility assumes a higher priority. GnRH administration prior to chemotherapy or transposition of the ovaries prior to radiotherapy might reduce ovarian follicular damage. Embryo cryopreservation is an

established technique that is available for fertility preservation, providing a delay in the initiation of treatment and the patient has a partner. Cryopreservation of oocytes after ovarian stimulation is another approach for single women. For many adulthood cancers, however, treatment start shortly after diagnosis, not allowing enough time for ovarian stimulation. In children, ovarian stimulation for oocyte and embryo cryopreservation is not considered ethical. Banking of ovarian tissue is a promising option to preserve ovarian endocrine function in young girls and women risking ovarian failure as a result of medical treatment. Once the ovarian tissue is cryopreserved, future options include transplantation of the tissue back to the donor (autotransplantation) or to nude mice (xenotransplantation), or to culture the follicles in vitro. The first child following orthotop transplantation was born in Belgium in 2004.

Litteratur

Abir R, Fisch B, Nitke S, Okon E, Raz A and Ben Rafael Z (2001) Morphological study of fully and partially isolated early human follicles. *Fertil Steril* 75,141–146.

Abrahamsen J, Bakken AM, Bruserud Ø et al. Flow cytometric measurement of apoptosis and necrosis in cryopreserved PBPC concentrates from patients with malignant diseases. *Bone Marrow Transplant* 2002; 92: 165 - 71.

Al-Shawaf T, Yang D, al-Magid Y, et al.(1993) Ultrasonic monitoring during replacement of frozen/thawed embryos in natural and hormone replacement cycles. *Hum Reprod* 8:2068-2074.

Arav A, Revel A, Nathan Y, Bor A, Gacitua H, Yavin S, Gavish Z, Uri M and Elami A (2005) Oocyte recovery, embryo development and ovarian function after cryopreservation and transplantation of whole sheep ovary. *Hum Reprod* 20,3554–3559.

Baka SG, Toth TL, Veeck LL, et al. Evaluation of the spindle apparatus of in-vitro matured human oocytes following cryopreservation of oocytes and embryos: use of a mouse model to investigate effects upon zona hardness and formulate treatment strategies in an in-vitro fertilization programme. *Hum Reprod* 1995; 10:1816-1820.

Baker TG. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1963; 21:160-4

Baker TG. Radiosensitivity of mammalian oocytes with particular reference to the human female. *Am J Obstet Gynaecol.* 1971 Jul 1;110(5):746-61.

Barnes DWH, Loutit JF. The radiation recovery factor: preservation by the Polge-Smith-Parks technique. *J Natl Cancer Inst* 1995; 15:901

Bath LE, Wallace WH, Shaw MP et al. Depletion of ovarian reserve in young women after treatment for cancer in childhood: detection by anti-Müllerian hormone, inhibin B and ovarian ultrasound. *Hum Reprod* 2003; 18: 2368-74.

Bath LE. Hypothalamic-pituitary-ovarian dysfunction after prepubertal chemotherapy and cranial irradiation for acute leukaemia. *Hum Reprod* 2001; 16: 1838-44.

Bath LE. Ovarian and uterine characteristics after total body irradiation in childhood and adolescence: response to sex steroid replacement. *Brit J Obstet Gynaecol* 1999; 106: 1265-72.

Blumenfeld Z, Dann E, Avivi I, et al. Fertility after treatment for Hodgkin's disease. *Ann Oncol* 2002; 13 Suppl 1:138-47

Brown JR, Modell E, Obasaju M and Ying YK (1996) Natural cycle in-vitro fertilisation with embryo cryopreservation prior to chemotherapy for carcinoma of the breast. *Hum Reprod* 11,197–199.

Carroll J and Gosden RG (1993) Transplantation of frozen–thawed mouse primordial follicles. *Hum Reprod* 8,1163–1167.

Chambers SK, Chambers JT, Holm C, et al. Sequelae of lateral ovarian transposition in unirradiated cervical cancer patients. *Gynecol Oncol* 1990; 39:155-9

- Chen C (1986) Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet* 1, 884–886
- Chen C, Chen S, Chang F, Wu G, Liu J and Yu C (2005) Autologous heterotopic transplantation of intact rabbit ovary after cryopreservation. *Hum Reprod* 20(Suppl 1), i149–i150.
- Chu JY, Craddock TV, Danis RK, et al. Ovarian tumor as manifestation of relapse in acute lymphoblastic leukaemia. *Cancer* 1981;48:377-379.
- Critchley HOD. Abdominal irradiation in childhood: the potential for pregnancy. *Brit J Obstet Gynaecol* 1992; 99: 392-4.
- Dolmans MM, Michaux N, Camboni A, Martinez-Madrid B, Van Langendonck A, Nottola S and Donnez J (2006) Evaluation of Liberase, a purified enzyme blend, for the isolation of human primordial and primary ovarian follicles. *Hum Reprod* 21(2),413–420.
- Donnez J and Bassil S (1998) Indications for cryopreservation of ovarian tissue. *Hum Reprod Update* 4,248–259.
- Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, Martinez-Madrid B and Van Langendonck A (2004) Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 364,1405–1410.
- Donnez J, Dolmans MM, Martinez-Madrid B, Demylle D and Van Langendonck A (2005) The role of cryopreservation for women prior to treatment of malignancy. *Curr Opin Obstet Gynecol* 17,333–338.
- Donnez J, Godin PA, Qu J and Nisolle M (2000) Gonadal cryopreservation in the young patient with gynaecological malignancy. *Curr Opin Obstet Gynecol* 12,1–9.
- Faddy M.J, Gosden R.G et al. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Hum Reprod* 1992; 1342-1346.
- Fisher B, Cheung AY. Delayed effect of radiation therapy with or without chemotherapy on ovarian function in women with Hodgkin's disease. *Acta Radiol Oncol* 1984; 23: 43-48.
- Gosden et al. Impact of congenital or experimental hypogonadotrophism on the radiation sensitivity of the mouse ovary. *Hum Reprod* 1997; 12: 2483-2488.
- Gosden RG, Baird DT, Wade JC and Webb R (1994) Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at –196°C. *Hum Reprod* 9,597–603.
- Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 1996; 17: 121-55.
- Green DM et al. Pregnancy outcome after treatment for acute lymphoblastic leukaemia during childhood or adolescence. *Cancer* 1989; 64: 2335-9.
- Green DM. Preserving fertility in children treated for cancer. *BMJ* 2001; 323: 1201.
- Hovatta O, Wright C, Krausz T, Hardy K and Winston RML (1999) Human primordial, primary and secondary ovarian follicles in long-term culture: effect of partial isolation. *Hum Reprod* 14,2519–2524.
- Howell S, Shalet S. Gonadal damage from chemotherapy and radiotherapy. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1998; 27: 927-943.
- Hubel A. Parameters of cell freezing: implications for the cryopreservation of stem cells. *Transfus Med Rev* 1997; 11: 224 - 33.

- Imoedemhe DG og Sigue AB (1992). Survival of human oocytes cryopreserved with or without the cumulus in 1,2-propanediol. *J Assist Reprod Genet* 9:323-327.
- Kaipia A, Hsueh AJW. Regulation of ovarian follicle atresia. *Annu Rev Physiol* 1997; 59: 349-63.
- Katayama KP, Stehlik J, Kuwayama M, Kato O and Stehlik E (2003) High survival rate of vitrified human oocytes results in clinical pregnancy. *Fertil Steril* 80,223–224.
- Kauff ND, Satagopan JM, Robson ME, et al. Risk-reducing salpingo-oophorectomy in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. *N Engl J Med* 2002;346:1609-1615.
- Kazem R, Thompson LA, Srikantharajah A, et al (1995). Cryopreservation of human oocytes and fertilization by two techniques: in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 10: 2650-2654.
- Kreftregisteret. Kreft i Norge 2004. Kreftregisteret 2006
- Kuleshova LL, Lopata A. Vitrification can be more favourable than slow cooling. *Fertil Steril* 2002; 78: 449 - 54.
- Larsen EC, Muller J, Rechnitzer C et al. Diminished ovarian reserve in female childhood cancer survivors with regulr menstrual cycles and basal FSH<10 IU/l. *Hum Reprod.* 2003 Feb; 18(2):417-422.
- Liede A, Narod SA. Hereditary breast and ovarian cancer in Asia: genetic epidemiology of BRCA1 and BRCA2. *Hum Mutat* 2002;20:413-424.
- Lovelock J. The haemolysis of human red blood cells by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta* 1953; 10: 414 - 26.
- Lucifero D, mertineit C, Clarke HJ, et al. Methylation dynamics of imprinted genes in mouse germ cells. *Genomics* 2002;79:530-538.
- Lushbaugh CC,Casarett GW. The effects of gonadal irradiation in clinical radiation therapy: a review. *Cancer* 1976; 37 (Suppl 2) 1111-1125.
- Luyet B. The vitrification of organic colloids and protoplasm. *Biodynamica* 1937; 1: 1 – 14
- Mandelbaum J, Junca AM, Tibi C, et al. (1988). Cryopreservation of immature and mature hamster and human oocytes. *Ann NY Acad Sci* 541:550-561.
- Martinez-Madrid B, Dolmans MM, Van Langendonckt A, Defrère S and Donnez J (2004b) Freeze-thawing intact human ovary with its vascular pedicle with a passive cooling device. *Fertil Steril* 82(5),1390–1394.
- Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol* 1963; 47: 347 - 69.
- McCall ML, Keaty EC, Thomson JD. Conservation of ovarian tissue in the treatment of carcinoma of the cervix with radical surgery. *Am J Obstet Gynecol* 1958; 75:590-600
- McCarville MB, Hill DA, Miller BE, et al. Secondary ovarian neoplasms in children: imaging features with histopathological correlation. *Pediatr Radiol* 2001;31:358-364.

Meirow D, Ben Yehuda D, Prus D, Poliak A, Schenker JG, Rachmilewitz EA and Lewin A (1998) Ovarian tissue banking in patients with Hodgkin's disease: is it safe? *Fertil Steril* 69,996–998.

Meirow D, et al. An in-vitro study of the effects of chemotherapy on human primordial follicles. *Hum Reprod* 1998; 13.

Meirow D, Nugent D. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. *Hum Reprod Update* 2001; 7: 535-543.

Morice et al. Ovarian transposition for patients with cervical carcinoma treated by radiosurgical combination. 2000; 74: 743-748.

Morita Y, Perez GI, Maravei DV, et al. Targeted expression of Bcl-2 in mouse oocytes inhibits ovarian follicle atresia and prevents spontaneous and chemotherapy-induced oocyte apoptosis in vitro. *Mol Endocrinol* 1999; 13:841-50

Morita Y, Perez GI, Paris F, et al. Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy. *Nat Med* 2000 Oct;6(10):1109-14

Newton H. The cryopreservation of ovarian tissue as a strategy for preserving the fertility of cancer patients. *Hum Reprod Update*. 1998 May-Jun;4(3):237-47

Oktay K. Ovarian cryopreservation and transplantation: preliminary findings and implications for cancer patients. *Hum Reprod Update* 2001;7:526-534.

Oktay K and Tilly J (2004) Livebirth after cryopreserved ovarian tissue autotransplantation. Correspondence. *Lancet* 364,2091–2092.

Oktay K, Buyuk E, Libertella N, Akar M and Rosenwaks Z (2005) Fertility preservation in breast cancer patients: a prospective controlled comparison of ovarian stimulation with tamoxifen and letrozole for embryo cryopreservation. *J Clin Oncol* 23,4347–4353.

Oktay K, Buyuk E, Rosenwaks Z, et al. A technique for transplantation of ovarian cortical strips to the forearm. *Fertil Steril* 2003; 80:193-198.

Oktay K, Buyuk E, Veeck L, Zaninovic N, Xu KP, Takeuchi T, Opsahl M and Rosenwaks Z (2004) Embryo development after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 363,837–840.

Oktay K, Economos K, Kan M, et al. Endocrine function and oocyte retrieval after autologous transplantation of ovarian cortical strips to the forearm. *JAMA* 2001; 286:1490-1493.

Oktay K, Kan MT og Rosenwaks Z (2001). Recent progress in in oocyte and ovarian tissue cryopreservation and transplantation. *Curr Opin Obstet Gynecol* 13:263-268.

Oktay K, Newton H, Aubard Y, Salha O and Gosden RG (1998a) Cryopreservation of immature human oocytes and ovarian tissue: an emerging technology? *Fertil Steril* 69,1–7.

Oktay K, Newton H og Gosden RG (2000). Transplantation of cryopreserved human ovarian tissue results in follicle growth initiation in SCID mice. *Fertil Steril* 73:599-603.

Oktay KH, Yih M. Preliminary experience with orthotopic and heterotopic transplantation of ovarian cortical strips. *Semin Reprod Med* 2002;20:63-74.

Park SE, Son WY, Lee SH et al (1997). Chromosome and spindle configurations of human oocytes matured in vitro after cryopreservation at the germinal vesicle stage. *Fertil Steril* 68:920-926.

- Pegg DE. The history and principles of cryopreservation. *Sem Reprod Med* 2002; 20: 5 – 13
- Pellestor F, Andreo B, Arnal F, Humeau C, Demaille J. Maternal aging and chromosomal abnormalities: new data drawn from in vitro unfertilized human oocytes. *Hum Genet.* 2003 Feb;112(2):195-203.
- Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 1949; 164: 666.
- Porcu E (2001). Oocyte freezing. *Semin Reprod Med* 19,221-230.
- Porcu E, Fabbri R, Seracchioli R, Ciotti PM, Magrini O and Flamigni C (1997) Birth of a healthy female after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. *Fertil Steril* 68,724–726.
- Rebbeck TR, Lynch HT, Neuhausen SL, et al. Prophylactic oophorectomy in carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations. *N Engl J Med* 2002;346:1616-1622,
- Rowley S. Hematopoietic stem cell cryopreservation: a review of current techniques. *J Hematother* 1992; 1: 233 - 50.
- Sauer MV, Paulson RJ, Lobo RA. Pregnancy after age 50: application of oocyte donation to women after natural menopause. *Lancet* 1993; 341: 321-323.
- Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology* 2000; 53:59-72.
- Shaw JM, Bowles J, Koopman P, et al. Fresh and cryopreserved ovarian tissue samples from donors with lymphoma transmit the cancer to graft recipients. *Hum Reprod* 1996; 11:1668-1673.
- Smith M, Hare ML. An overview of progress in childhood cancer survival. *J Pediatr Oncol Nurs.* 2004; 21: 160-4.
- Smitz JE and Cortvrindt RG (2002) The earliest stages of folliculogenesis in vitro. *Reproduction* 123,185–202.
- Son WY, Yoon SH, Yoon HJ, et al. Pregnancy outcome following transfer of human blastocysts vitrified on electron microscopy grids after induced collapse of the blastocoele. *Hum Reprod* 2003; 18: 137-139.
- Sonmezer M and Oktay K. Fertility preservation in female patients. *Human Reproduction*, 2004; 10: 251-266
- Struewing JP, Abeliovich D, Peretz T et al. The carrier frequency of the BRCA1 185delAG mutation is approximately 1 percent in Ashkenazi Jewish individuals. *Nat Genet* 1995;11:198-200.
- Struewing JP, Hartge P, Washolder S, et al. The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* 1997;336:1401-1408.
- te Velde ER, Sheffer GJ, et al. Developmental and endocrine aspects of normal ovarian aging. *Molecular and Cellular Endocrinology* 145 (1998) 67-73.
- Tease C, Fisher G. The influence of maternal age on radiation-induced chromosome aberrations in mouse oocytes. *Mutat Res* 1991; 262: 57-62.

- Thibaud E, Ramirez M, Brauner R et al. Preservation of ovarian function by ovarian transposition performed before pelvic irradiation during childhood. *J Pediatr* 1992; 121:880-884
- Treolar A.E. Menstrual cyclicity and the perimenopause. *Maturitas* 1981; 3: 49-64.
- Tucker MJ, Wright G, Morton PC et al (1996). Preliminary experience with human oocyte cryopreservation using 1,2-propanediol and sucrose. *Hum Reprod* 11,1513-1515.
- van Noord PA, Dubas JS, Dorland M et al. Age at natural menopause in a population-based screening cohort: the role of menarche, fecundity and lifestyle factors. *Fertil Steril* 1997; 68: 95-102.
- Vendola K, Zhou J, Adensanya O et al. Androgens stimulate early stage of follicular growth in the primate ovary. *The Journal of Clinical Investigation* 1998; 101:2622-2629.
- Wallace et al. The radiosensitivity of the human oocyte. *Hum Reprod* 2003; 18: 117-121.
- Wallace WH. Ovarian failure following abdominal irradiation in childhood: natural history and prognosis. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 1989; 1: 75-9.
- Wallace WHB. The radiosensitivity of the human oocyte. *Hum Reprod* 2003; 18: 117-21.
- Wang JX, Yap YY, Matthews CD. Frozen-thawed embryo transfer: influence of clinical factors on implantation rate and risk of multiple conception. *Hum Reprod* 2001; 16:2316-2319.
- Wang X, Chen H, Yin H, Kim SS, Lin Tan S and Gosden RG (2002) Fertility after intact ovary transplantation. *Nature* 415,385.
- Waxman JH, Ahmed R, Smith D, Wrigley PF, Gregory W, Shalet S, Growther D, Rees LH, Beeser GM, Malpas J et al. Failure to preserve fertility in patients with Hodgkin's disease. *Cancer Chemother Pharmacol* 1987; 19:159-162
- Wu J, Zhang L and Wang X (2001) In vitro maturation, fertilization and embryo development after ultrarapid freezing of immature human oocytes. *Reproduction* 121,389–393.
- Wyld PJ, Lilleymans JS. Ovarian disease in childhood lymphoblastic leukaemia. *Acta Haematol* 1983;69:278-280.
- Yada-Hashimoto N, Yamamoto T, Kamiura S et al. Metastatic ovarian tumors: a review of 64 cases. *Gynecol Oncol* 2003;89:314-317.
- Zhang X, Li K, Tau KH et al. Trehalose ameliorates the cryopreservation of cord blood in a preclinical system and increases the recovery of CFUx, long-term culture-initiating cells, and nonobese diabetic-SCID repopulating cells. *Transfusion* 2003; 43: 265 - 72.